

31671-113164 #7

Masaharu NODA et al.

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 8月 4日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-237320

出 願 人

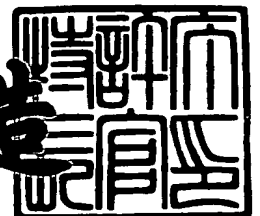
Applicant(s):

科学技術振興事業団

2001年 6月15日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3056709

【書類名】 特許願

【整理番号】 A011P24

【提出日】 平成12年 8月 4日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A01K 67/027

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県岡崎市竜美台 2 丁目 7 番地 9

【氏名】 野田 昌晴

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県岡崎市竜美台 2 丁目 2 番地 1

【氏名】 渡邊 英治

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代表者】 川崎 雅弘

【代理人】

【識別番号】 100107984

【弁理士】

【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 044347

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】  $\text{Na}_v 2$  チャネル遺伝子欠損非ヒト動物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示すことを特徴とするヌル変異非ヒト動物。

【請求項 2】  $\text{Na}_v 2$  遺伝子機能が染色体上で欠損したことを特徴とする請求項 1 記載のヌル変異非ヒト動物。

【請求項 3】 非ヒト動物が、齧歯目動物であることを特徴とする請求項 2 記載のヌル変異非ヒト動物。

【請求項 4】 齧歯目動物が、マウスであることを特徴とする請求項 3 記載のヌル変異非ヒト動物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示す、 $\text{Na}_v 2$  チャネル遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物に関する。

【0002】

【従来の技術】

電位依存性ナトリウムチャネルは、電位依存性カリウムチャネルとともに、神経細胞、筋肉細胞等の興奮性細胞において活動電位の発生と伝播に中心的役割を担うイオンチャネルとして知られている。ナトリウムチャネルタンパク質は、電位検出系をもつイオン選択的チャネルを構成し、270 kDa の糖タンパク質からなる  $\alpha$ -サブユニットと、1つ又は2つのより小さい  $\beta$ -サブユニットから構成されている。電位依存性ナトリウムチャネルは、細胞膜が静止電位（通常 -70 ～ -90 mV）にある時は閉じているが、細胞膜が脱分極するとチャネルが開き、1 msec 程度の後にチャネルが閉じることから、ナトリウムチャネルタンパク質分子は、膜電位を感受する電位センサーとそれに連動して動く活性化依存

性、ナトリウムイオンを選択的に透過するための選択性フィルター、及び不活性化依存性を構成しているといわれている。

#### 【 0 0 0 3 】

本発明者等による脳のナトリウムチャンネルタンパク質  $\alpha$ -サブユニット cDNA タイプ I、II 及び III の同定 (Nature 320, 188-192 (1986)、FEBS Lett. 228, 187-194 (1988)) 以来、多くの構造的に関連する  $\alpha$ -サブユニットのアイソフォームが各種の組織からクローニングされており、これらは多重遺伝子族を形成している。最近になって興奮性細胞のほかにも、グリア細胞もまた電位感受性ナトリウム電流を発現することが見出され (Trends Neurosci. 19, 325-332 (1996))、in situ ハイブリダイゼーション、RT-PCR、ノーザンブロット及び免疫細胞化学などの手法によって、グリア細胞における脳-タイプ I、II、III、H1、Na<sub>s</sub>、NaCH6 等の存在が報告されている (Glia 26, 92-96 (1999))。しかし、いわゆる電氣的に非興奮性の細胞における電位依存性ナトリウムチャンネルの機能は解明されていない。

#### 【 0 0 0 4 】

数年前電位依存性ナトリウムチャンネル  $\alpha$ -サブユニットと相同性のある部分 cDNA がラット星状膠細胞に由来する cDNA ライブラリーからクローニングされ NaG と命名された (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 7272-7276 (1992))。これに引き続き同様な  $\alpha$ -サブユニットアイソフォームが各種の動物種から独立にクローニングされている。例えば、ヒトの心臓からの Na<sub>v</sub>2.1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4893-4897 (1992))、マウスの動脈腫瘍細胞株からの Na<sub>v</sub>2.3 (J. Biol. Chem. 269, 30125-30131) 及び NaG のスプライシングヴァリエントに相当するラットの脊髄神経節由来の SCL11 が報告されている (FEBS Lett. 400, 183-187 (1997))。これらは配列の相同性から、異なる種における対応する遺伝子 (species orthologues) とも考えられ、電位依存性ナトリウムチャンネル (NaCh)  $\alpha$ -サブユニットファミリーの中で異なるサブファミリーすなわちサブファミリー 2 NaCh (Na<sub>v</sub>2) に分類することができる。それらの全アミノ酸配列は、先にクローニングされた電位依存性ナトリウムチャンネル群に比べ相同性が 50% 以下と低く、イオン選択性や電位依存性の活性化・不活性化に関連

する領域においてすらもその配列は特異的である。それらの領域は他の全てのサブファミリーメンバーにおいては完全に保存されていることから、 $\text{Na}_v2$ は特別なチャネル特性をもっていると考えられるが、機能的 $\text{Na}_v2$ チャネルをアフリカツメガエル卵母細胞、CHO細胞、HEK293細胞などを用いる異種発現系で発現させる試みはこれまで成功しておらず、生体内における $\text{Na}_v2$ チャネルの機能については全くわかっていなかった。

## 【0005】

$\text{NaG}/\text{SCL11}$ は、星状膠細胞からクローニングされたので、星状膠細胞で発現される電位依存性ナトリウムチャネル( $\text{NaCh}$ )の1つと考えられてきたが、その後のin situハイブリダイゼーションにより $\text{Na}_v2$ は生体内では星状膠細胞に発現しておらずシュワン(Schwann)細胞及び脊髄感覚ニューロンにおいて発現していることが明らかにされた(Glia 21,269-276(1997))。 $\text{NaG}$ のmRNAは神経系以外、特に肺や心臓に比較的高レベルで検出され、さらに、 $\text{NaG}$ のmRNAが中枢神経系に存在することがRNaseプロテクション及びノーザンブロット法で示されたが、非同位体プローブを用いるin situハイブリダイゼーションによつては $\text{NaG}$ のmRNAは(mesencephalic nucleus V)の中脳核以外において検出できないことが報告されている(Mol.Brain Res.45,71-82(1997))。このことから、 $\text{NaG}$ のmRNAは中枢神経系全体に低レベルで発現するか又は中枢神経系の特定の領域で限定的に発現しているであろうと考えられる。 $\text{NaG}$ チャネルがこのように幅広い組織、電氣的に非興奮性の細胞を含む幅広い細胞種に分布していることから、 $\text{NaG}$ チャネルは活動電位の発生と伝播以外の機能があると考えられる。

## 【0006】

## 【発明が解決しようとする課題】

現在まで、水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ異常な高張塩分の摂取挙動を示す、塩分過剰摂取実験モデル動物は知られていない。本発明の課題は、かかる塩分過剰摂取実験モデル動物として有用な、水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示すヌル変異非ヒ

ト動物、例えば  $\text{Na}_v2$  チャネル遺伝子欠損非ヒト動物を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、生体内における機能が不明であった  $\text{Na}_v2$  チャネルの機能や役割を明らかにするために鋭意研究し、 $\text{Na}_v2$  チャネルノックアウトマウスを作製し、 $\text{Na}_v2$  チャネルが脳内脊髄液におけるナトリウムイオンレベルを感知して指令を出す役割を担っていることを確認し、この  $\text{Na}_v2$  チャネルノックアウトマウスが水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ高張塩分を多量に摂取するという異常な挙動を示すことを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち本発明は水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示すことを特徴とするヌル変異非ヒト動物（請求項1）や、 $\text{Na}_v2$  遺伝子機能が染色体上で欠損したことを特徴とする請求項1記載のヌル変異非ヒト動物（請求項2）や、非ヒト動物が、齧歯目動物であることを特徴とする請求項2記載のヌル変異非ヒト動物（請求項3）や、齧歯目動物が、マウスであることを特徴とする請求項3記載のヌル変異非ヒト動物（請求項4）に関する。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明のヌル変異非ヒト動物としては、水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示す非ヒト動物であれば特に制限されるものではないが、かかる非ヒト動物として、 $\text{Na}_v2$  遺伝子機能が染色体上で欠損したヌル変異非ヒト動物を具体的に例示することができる。ここで、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動とは、例えばマウスにおいては24時間水分飢餓条件下で0.3Mの食塩水の摂取量が野生型、好ましくは同腹の野生型に比べ1.5倍以上、より好ましくは2倍以上摂取する挙動をいい、また、 $\text{Na}_v2$  遺伝子機能が染色体上で欠損したヌル変異非ヒト動物とは、 $\text{Na}_v2$  をコードする非ヒト動物の内在

性遺伝子が破壊・欠損・置換等により不活性化され、 $\text{Na}_v 2$ を発現する機能を失った非ヒト動物をいい、また非ヒト動物とは、マウス、ラット等の齧歯目動物を具体的に挙げることができるが、これらに限定されるものではない。以下、非ヒト動物がマウスの場合を例にとって説明する。

## 【0010】

$\text{Na}_v 2$ ノックアウトマウスの作製法としては、 $\text{Na}_v 2$ を発現する機能を失ったノックアウトマウスを作製することができる方法であればどのような作製法でもよいが、例えば、マウス $\text{Na}_v 2$ の種対応物であるラット $\text{Na}_v 2$ をコードするcDNAをプローブとして、マウスのゲノムDNAライブラリーをスクリーニングし、ゲノムDNAの $\text{Na}_v 2$ 遺伝子を単離し、 $\text{Na}_v 2$ のエキソン部分に、例えばネオ遺伝子等マーカー遺伝子を挿入してターゲットベクターを作製し、作製されたターゲットベクターをエレクトロポレーション法によってES細胞に導入し、相同的組換えを起こしたES細胞を選択し、このES細胞系を用いて生殖系列のキメラマウスを作製し、野生型マウスと交配させることによって得られるヘテロ接合体マウス（F1：雑種第一代）同士を交配させることによって、メンデルの法則に従い産生する $\text{Na}_v 2$ ノックアウトマウスと同腹の野生型マウスを作製することができる。

## 【0011】

以下に、実施例を挙げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の技術的範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

## [ターゲットベクターの構築]

ターゲットベクターを構築するため、タンパクコーディングエクソン1、2及び3を含むマウスのゲノム断片を、ラットの $\text{Na}_v 2$ /SCL11プローブによってクローニングした。まず、細胞株R1から作られたマウスのゲノムライブラリー（大阪大学の森博士から供与）から、ラットの $\text{Na}_v 2$ cDNAの446bp断片（最初の3つのコーディングエクソンを含むヌクレオチド残基11-456：GenBankアクセッション番号Y09164：配列番号1）でハイブリダイズさせて9個の独立のゲノムクローンを分離した。数種の制限酵素を用いるサザンブロット分析により、これら全てのオーバーラップクローンが単一のゲノム遺伝子座

に由来することを確認した。ハイブリダイゼーションポジティブな3.2 kb及び3.7 kbのHind III断片をpBluescript IISK(-) (Stratagene社製) にサブクローニングした後、DNA配列を決定した(配列はGenBankのアクセッション番号AF190472: 配列番号2)。3.2 kb断片は、タンパクコーディングエクソン1 (5' 非翻訳領域の13塩基とマウスNa<sub>v</sub>2タンパクコーディング配列の最初の238塩基: GenBankアクセッション番号L36179のヌクレオチド残基238-490) を含み、3.7 kb断片はエクソン2 (同ヌクレオチド残基491-609) 及びエクソン3 (同ヌクレオチド残基610-701) を含んでいた。この3つのエクソンをコードしているDNA配列はTamkun等 (J. Biol. Chem. 269, 30125-30131 (1994)) によってクローニングされたマウスのNa<sub>v</sub>2.3 cDNAと同じであった。クローニングされたゲノム断片は4つの制限酵素 (BamH I, Bgl II, EcoR I, Hind III) についてのサザンブロットの結果、マウスのゲノムDNAと同じ制限酵素地図を示した。この知見から、マウスのNa<sub>v</sub>2.3はラットのNa<sub>v</sub>Gの種対応物であることが明らかになった。したがって、Na<sub>v</sub>2.3、Na<sub>v</sub>G及びSCL11をNa<sub>v</sub>2と命名した。

#### 【0012】

ターゲッティングベクターを構築するために、lacZ遺伝子をマウスNa<sub>v</sub>2遺伝子のタンパクコーディングエクソン1に挿入し、マウスNa<sub>v</sub>2のN末端の20アミノ酸配列がβ-ガラクトシダーゼと融合するようにデザインした。すなわち、3つのエクソンを含む12.5 kbのSal I断片をpDT-A (Anal. Biochem. 214, 77-86 (1993)) のXho Iサイトに挿入し、次いで、lacZ-neoカセットのSal I-Xho I断片をエクソン1の内因性のXho Iサイトに導入した(図1a参照)。これによってマウスNa<sub>v</sub>2タンパクの最初の20アミノ酸をβ-ガラクトシダーゼのN末端に融合した蛋白が発現する。また、ターゲットマウスにおいてマウスNa<sub>v</sub>2遺伝子の代わりにlacZ遺伝子を確実に発現させるために、lacZ-neoカセットを挿入したこと以外は、元のマウスNa<sub>v</sub>2遺伝子のゲノム構造そのままとした。サザンブロットスクリーニングにおいて外因的制限サイトとして利用することができるように、lacZ-neoカセットの5'末端にEcoR Iリンカーを予め挿入した。なお、図1a中、上段はターゲットベクタ



一の制限酵素地図を、中段は野生型のマウス  $\text{Na}_v 2$  遺伝子座を、下段は組換え体の遺伝子座をそれぞれ示し、図中の制限サイト B は  $\text{BamH I}$ 、B g は  $\text{Bgl II}$ 、E は  $\text{EcoR I}$ 、H は  $\text{Hind III}$ 、X は  $\text{Xho I}$  をそれぞれ意味する。

## 【 0 0 1 3 】

[  $\text{Na}_v 2$  ノックアウトマウスの作製 ]

線状化した上記ターゲットベクターを、エレクトロポレーション法によって ES 細胞 ( 1 2 9 / SV マウス由来の R 1 セルライン ) に導入した。文献 ( *Neurosci. Lett.* 247, 135-138 (1998) ) 記載の方法に準じて、ネオマイシン耐性 ES クローンを G 4 1 8 によって選択し、ターゲットクローンのスクリーニングを行った。相同組換えをプローブ 1 ( 図 1 a 参照 ; エクソン 1 の  $\text{Xho I}$  から約 8 k b 上流に位置している 0. 3 k b の  $\text{EcoR I}$  -  $\text{Xba I}$  断片 ) により  $\text{EcoR I}$  消化を用いるサザンブロットで確認した。また、選択されたクローンをプローブ 2 ( neo 遺伝子由来の 0. 6 k b の  $\text{Pst I}$  断片 ) でチェックした。1つのセンスプライマー ( プライマー 1、エクソン 1 の 5' 末端領域にある  $\text{ATGTTGACTTCCC CAGAGCC}$  : 配列番号 3 ) 及び 2 つのアンチセンスプライマー ( プライマー 2、1 a c Z の 5' 末端領域にある  $\text{AACCAGGCAAAGCGCCATTC}$  : 配列番号 4、プライマー 3、エクソン 1 の 3' 末端領域にある  $\text{CATCTTTC CAAGGGCTCTGACA}$  : 配列番号 5 ) を用いるゲノム PCR により標的とされる遺伝子座を確認した。PCR 増幅は、 $\text{EX-Taq}$  ポリメラーゼ ( *Takara* 社製 ) によりその製造者のプロトコルに従いプログラム可能なサーマルサイクラーを用いて 2 段階で実行した ( 第 1 段階 ;  $95^{\circ}\text{C}$  5 分間、 $60^{\circ}\text{C}$  1 分間、 $72^{\circ}\text{C}$  1 分間。第 2 段階 ;  $95^{\circ}\text{C}$  30 秒、 $60^{\circ}\text{C}$  30 秒、 $72^{\circ}\text{C}$  1 分間 ) 。

## 【 0 0 1 4 】

9 8 個の ES クローンから得られた、相同組換えが起こったアレルをもっていることが確認された 2 個の ES クローンを、8 細胞期の C 5 7 B L / 6 J マウス胚に導入された。導入された胚は M 1 6 培地中で 1 夜胚盤胞まで培養され、7 ~ 1 0 個の胚盤胞が I C R マウスの子宮に移植された。このようにして得られた雄キメラマウスを C 5 7 B L / 6 J 雌マウスと交配させ、同腹子からヘテロ接合体マウス ( F 1 : 雑種第一代 ) を作出し、次いで、ホモ接合体マウスを得るために

、このヘテロ接合体マウスをインタークロスさせ、メンデルの法則に従い産生した  $Na_v2$  欠損マウスを作製した。

#### 【0015】

このヌル変異体動物（マウス  $Na_v2^{-/-}$ ）は健康で、繁殖可能で見た目に正常であった。ヘテロ接合体動物の繁殖から得られた458匹の4週令のマウスの遺伝子型解析の結果、野生型は29.5%（ $n=135$ ）、ヘテロ接合体は48.2%（ $n=221$ ）、ホモ接合体は22.3%（ $n=102$ ）であり、メンデル比率に近かった。これらのことは、ヘテロ接合体及びホモ接合体における胚の発育及び身体機能が大きく傷害されないことを示している。マウス  $Na_v2$  は周生期に一過性に子宮平滑筋に発現が誘導されることが報告されている（J.Biol.Chem.269,30125-30131(1994)及びAm.J.Physiol.270,C688-696(1996)）が、 $Na_v2^{-/-}$ マウスにおいては子は正常に生まれたことは注目に値する。また、ヌル変異体におけるlacZ発現パターンは発現の強さに差があるもののヘテロ接合体のそれと同じであったことは、マウス  $Na_v2$  の欠損はマウス  $Na_v2$  発現細胞の分化又は生存能力に影響しないことを示している。

#### 【0016】

野生型(+/+）、ヘテロ接合体(+/-)及びホモ接合体(-/-)のそれぞれのマウスの尾からサンプルゲノムDNAを採取し、EcoR Iで消化したゲノムDNAがブロットされた膜をターゲットベクターの5'側にある前記プローブ1とハイブリダイズさせたサザンブロット分析の結果を図1bに示す。図1bの右側には、野生型（18kb）及び組換型（10kb）の遺伝子型のサイズが示されている。また、野生型(+/+）、ヘテロ接合体(+/-)及びホモ接合体(-/-)のそれぞれのマウスのゲノムPCR分析の結果を図1cに示す。図1cの右側には、野生型（200bp）と組換型（400bp）の遺伝子型のサイズが示されている。

#### 【0017】

[ $Na_v2$  ノックアウトマウスにおける  $Na_v2$  不発現の確認]

変異体マウスのマウス  $Na_v2$  タンパク発現をウエスタンブロットで試験した。野生型(+/+）、ヘテロ接合体(+/-)及びホモ接合体(-/-)のそれぞれのマウスの肺組織サンプルをKnittle等の方法（Am.J.Physiol.270,C688-696(1996)）により調

製した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びイムノブロッティングを文献 (Neurosci.Lett.247,135-138(1998)) 記載の方法で行った。抗マウス  $\text{Na}_v2.3$  抗血清 (コロラド州立大学Tumkun博士から供与) をPBSで1:500に希釈して使用した。イムノブロットは数種の非免疫血清とインキュベートし、非特異的な結合でないことを確認した。結果を図1dに示す。図1dの右側には、 $\text{Na}_v2$  タンパク (220 kDa) の位置が示されている。 $\text{Na}_v2$  タンパクは高度にグリコシル化されておりSDS-含有緩衝液においてすら容易に凝集するため、ナトリウムチャネルは広いバンドとなっているが、ヘテロ接合体 ( $\text{Na}_v2^{+/-}$ ) マウスでは野生型の約半量のマウス  $\text{Na}_v2$  タンパクが肺膜から検出され、ホモ接合体 ( $\text{Na}_v2^{-/-}$ ) マウスではマウス  $\text{Na}_v2$  タンパクは検出されなかった。マウス  $\text{Na}_v2$  タンパクが発現していないことから、このアレルがヌル変異体であることがわかる。

#### 【0018】

[X-Gal染色による  $\text{Na}_v2$  ノックアウトマウスにおける lacZ 発現の確認]

胚を3.5%のホルムアルデヒドPBS溶液中に室温にて1時間浸漬して固定し、正中線に沿って矢状面にかみそりでカットした。図2aは胚令15日 (E15) のマウス  $\text{Na}_v2^{+/-}$  の胚全体のX-Gal染色を示しており、強いβ-ガラクトシダーゼ活性が三叉神経節 (図2a中の矢頭) 及び脊髄神経節 (同矢印) において観察された (参考写真1参照)。また、lacZはこのE15マウスの肺 (同星印) においても発現していた。これらの器官におけるlacZの発現は成長しても持続し、脊髄神経節をX-Gal染色後に薄い切片とした時、β-ガラクトシダーゼ活性が種々の大きさの脊髄感覚ニューロンで検出された。図2bには、生後2日目の  $\text{Na}_v2^{+/-}$  マウスの脊髄神経節をX-Galで染色したクリオスタット組織切片が示されている (参考写真1参照)。lacZ発現は脊髄神経節のニューロン細胞体 (図2b中、神経路がアスタリスクで示されている。) に限定されており、軸索からは検出されなかった。また、同じようなlacZ発現のパターンが三叉神経節の組織切片でも観察することができた。図2cには、胸部における成育した交感神経幹のクリオスタット切片が示されている (参考写真

1 参照)。強く染色された多くの細胞は、細胞体の出現、分布、サイズからして、シュワン (Schwann) 細胞であると考えられる。また、1 a c Z 発現は心臓自律神経及び舌神経でも観察された。1 a c Z 発現のこれらのパターンは、ラット  $\text{Na}_v 2$  及びマウス  $\text{Na}_v 2$  発現に関する結果 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 7272-7276(1992)、FEBS Lett. 400, 183-187(1997)、Glia, 21, 269-276(1997)) とよく一致する。このことから 1 a c Z 遺伝子発現はマウス  $\text{Na}_v 2$  遺伝子の制御領域によって制御されていることがわかる。なお、図 2 c 中、矢頭はシュワン細胞の細胞体を示し、スケールバーは  $50 \mu\text{m}$  を表している。

【 0 0 1 9 】

[ $\text{Na}_v 2$  の生理学的な役割]

マウス  $\text{Na}_v 2$  の生理学的な役割を調べるため、 $\text{Na}_v 2^{+/-}$ マウスと  $\text{Na}_v 2^{-/-}$ マウスの脳を用いて中枢神経系における 1 a c Z 発現を調べた。生後間のない動物をペントバルビタール麻酔下において最初に P B S でついで固定剤で灌流した。固定された脳を冠状に  $2 \text{ mm}$  の厚さに又は矢方向にかみそりで切った。P B S で 2 回洗浄し、 $1 \text{ mg/ml}$  の X - G a l、 $5 \text{ mM}$  の  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、 $5 \text{ mM}$  の  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、 $2 \text{ mM}$  の  $\text{MgCl}_2$ 、 $0.2\%$  の N P - 4 0 を含む P B S 中で  $37^\circ\text{C}$  において一晩インキュベートした。免疫染色のため、X - G a l 染色された切片を冠状の  $14 \mu\text{m}$  の切片にクリオスタットミクロトームで切り、ゼラチンで被覆されたスライド上に載置した。抗ニューロフィラメント 2 0 0 ウサギポリクローナル抗体 (Sigma、N - 4 1 4 2) 又は抗グリア原繊維酸性タンパク (G F A P) ウサギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biochemistry、s c - 6 1 7 0) を用いて免疫染色した (Neurosci. Lett. 247, 135-138(1998))。マウス  $\text{Na}_v 2$  が成長個体の中枢神経系における特定のニューロン及び上皮細胞で発現していることを図 3 は示す (参考写真 2 参照)。

【 0 0 2 0 】

図 3 a - e は  $\text{Na}_v 2^{+/-}$ マウスの、図 3 f は  $\text{Na}_v 2^{-/-}$ マウスの中枢神経系における 1 a c Z 発現を示している。また、図 3 a, b, d, e 及び f は固定された成長個体の脳を冠状に、図 3 c は正中矢状面でそれぞれ  $2 \text{ mm}$  に切断し、X - G a l で染色したものである。なお、図 3 c においては脳の下頭蓋は除去しな

かった。図3eにおいて、ホモ接合変異体マウスが低レベル発現部位を検出する分析に用いられた。図3において、AH：前方視床下部領域 (anterior hypothalamic area)、MH：中央手綱核 (medial habenular nucleus)、ME：正中隆起 (median eminence)、OVL T：終板器官 (organum vasculosum laminae terminalis)、MPO：中央視索前領域 (medial preoptic area)、DMH：背中視床下部 (dorsomedial hypothalamus)、IPDM：背中部位の脚間核 (interpeduncular nucleus of the dorsomedial part)、MMR：正中縫線の中央部 (medial part of the median raphe)、NHP：神経下垂体 (neurohypophysis)、SFO：脳弓下器官 (subfornical organ)、CX：大脳皮質 (cerebral cortex)、BLA：扁桃体側低 (basolateral amygdala) をそれぞれ意味する。図3cにおいて、OVL T は中枢神経系から除去され頭蓋に付けられた。冠状の半全量脳は  $50\ \mu\text{m}$  の厚さにクリオスタットミクロトームで切り、抗ニューロフィラメントポリクローナル抗体 (図3g及びh)、抗GFAPポリクローナル抗体 (図3i)、又はクレシルバイオレット (cresyl violet) (図3j) により染色された。茶色のシグナルは、抗体と反応した部位である。サンプルはAH (図3g)、SFO (図3h及びi) 及びME (図3j) である。矢頭はダブルポジティブニューロンを示す。図3jの星印は、第三脳室を示す。背面はパネルの上方を向いている。図3g-hのスケールバーは  $30\ \mu\text{m}$  であり、図3jのスケールバーは  $100\ \mu\text{m}$  である。

#### 【0021】

図3からわかるように、lacZ発現は中枢神経系の次の特定部位に限られていることが判明した (図3a-f)。すなわち、MPO、AH、DMH、IPDM、MMR、MeV、MH、ME、SFO、OVL T 及びNHPである。ME、SFO、OVL T 及びNHPは脳室周囲器官 (CVO) として知られ、高密度、高透過性の毛細血管ネットワークをもち、血中への物質の分泌や中枢組織への物質浸入を促進する (FASEB J, 7, 678-686 (1993))。Na<sub>v</sub>2<sup>+/-</sup>マウスでは比較的弱いlacZの発現がCX及びBLAに見られたのに対し、Na<sub>v</sub>2<sup>-/-</sup>マウスにおけるこれらの部位でのlacZの発現はより顕著であった (図3f)。lacZを発現している細胞種を調べるため、脳をX-Galで染色しクリオスタットミ

クロトームで組織切片に切り、ついで抗ニューロフィラメントポリクローナル抗体又は抗グリア原繊維酸性タンパク (GFAP) ポリクローナル抗体で免疫染色するか、クレシルバイオレット染色を行ったところ、lacZ発現細胞の大部分はMPO, AH (図3g)、IPDM, MMR, MH及びMeV中のニューロフィラメントに対して陽性であった。また、GFAP陽性細胞はlacZ発現に対して陰性であり、このことは星状膠細胞がマウスNa<sub>v</sub>2に対し陰性であることを示している。

## 【0022】

CVOにおけるlacZ発現細胞の分布は特に重要であり、MEにおけるlacZ発現細胞は第3脳室の床に並んでいた (図3j)。この分布は線毛を持たない上皮細胞の位置と対応している。この細胞は脳脊髄液 (CSF)、神経細胞及び血管の間で結合している特殊な細胞であるタニサイトと考えられる (Neuroscience 3,277-283(1978))。これらはCSFと毛細管周縁空間の間の物質交換に関与していると考えられている。lacZ陽性細胞はSFO全体に亘ってまばらに分布し、その大部分はニューロフィラメントと共在し (図3h)、GFAPに対し陰性であった (図3i)。lacZ陽性細胞は第3脳室の全体に並んで集中的に存在し、これが上皮細胞であることを示唆している。NHPには、X-Galで密に染色された。これらはいわゆる下垂体細胞 (J.Exp.Biol.139,67-79(1988)) に対応すると思われる。

## 【0023】

## [Fos-イムノ組織化学]

lacZ発現の解析によって、マウスNa<sub>v</sub>2は4つの脳周囲器官及び中枢神経系のいくつかの神経核において発現することや、マウスNa<sub>v</sub>2発現細胞は組織分布のみならず細胞タイプにおいても多様性があることが判明したことから、Na<sub>v</sub>2チャンネルの機能、特性の決定が困難となったが、4つの脳周囲組織が体液ホメオスタシスに関与していると考えられていることから (FASEB J 7,678-686(1993)、Annu.Rev.Physiol.59,601-619(1997)、Physiol.Rev.78,583-686(1997)、Physiol.Rev.58,582-603(1978)、Ann.NY Acad.Sci,877,258-280(1999))、マウスNa<sub>v</sub>2チャンネルが体液容量オスモル濃度の感覚経路において機能していると仮

定すれば、これらの器官におけるそのチャネルの活性と遺伝子発現はマウス  $Na_v2$  変異体マウスにおいて影響を受けると想定された。そこで、マウス及びラットにおける細胞外液バランスに応じた神経活動の変化のマーカである Fos 核タンパクの中枢性発現に対して、水分飢餓がどのように影響するかを以下のように調べた。

## 【0024】

水分充足状態及び水分飢餓状態におかれた、脳の中央視索前核 (MnPO)、終板器官 (OVL T)、脳弓下器官 (SFO)、室旁核 (PVN) 及び視索上核 (SON) の5つの領域における Fos-イムノポジティブ細胞の密度変化(時間に対する)について、水欠乏時間がゼロのマウス(マウス  $Na_v2^{+/+}$  につき  $n=4$ 、マウス  $Na_v2^{-/-}$  につき  $n=4$ )、水欠乏12時間のマウス ( $n=5$  及び  $5$ )、同24時間のマウス ( $n=6$  及び  $7$ )、同48時間のマウス ( $n=6$  及び  $5$ ) を用いて調べた。前記固定液で灌流したマウスの脳を同じ固定液に  $4^{\circ}\text{C}$  で一夜浸漬した後、脳をビブラトーム (Leica, VT1000S) 上で  $50\mu\text{m}$  の厚さの冠状切片とした。抗 Fos ヤギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biochemistry, sc-52-G) の PBS 1000 倍希釈液を用いてイムノ染色した。関連する領域を含む切片を選び、Fos-イムノ陽性核を数えた。各領域はイメージ分析システム (KS400 が付属した Axio phot 2) を用いて測定した。上記脳の5つの領域  $1\text{mm}^2$  当たりの核の数を測定した。結果を図4に示す(参考写真3参照)。

## 【0025】

図4aは、水分充足状態又は24時間水分飢餓状態の野生型(+/+)マウス及びヌル変異体(-/-)マウスの終板器官 (OVL T) 含有組織切片の典型的な像であり、スケールバーは  $200\mu\text{m}$  を示している。また図4bは、水分飢餓状態における脳弓下器官 (SFO)、視索上核 (SON)、室旁核 (PVN)、終板器官 (OVL T) 及び中央視索前核 (MnPO)  $1\text{mm}^2$  当たり中の Fos-イムノポジティブ細胞の数(平均)をプロットしたものであり、図中の縦棒は S. E. を示し、星印は  $Na_v2^{-/-}$  マウスと  $Na_v2^{+/+}$  マウスの間で有意差 ( $p<0.05$ ) が認められることを示している。水分充足条件下においては、Fos-イム

ノポジティブ細胞はテストしたどの領域においても検出されなかった。水分飢餓 12、24 及び 48 時間条件下において Fos-イムノポジティブ核を有する細胞数は、 $Na_v2^{-/-}$ マウスでも  $Na_v2^{+/+}$ マウスでも顕著に増加した。しかし、SFO 及び OVLT における  $Na_v2^{-/-}$ マウスにおける Fos-イムノポジティブ核は、 $Na_v2^{+/+}$ マウスに比べ 2 倍増加することが観察された。MnPO、PVN、及び SON においてはグループ間に差はなかった。

## 【0026】

## [行動解析]

次いでマウス  $Na_v2$  チャネル欠損がマウスの水分及び食塩摂取に及ぼす影響を調べた。行動解析を行うにあたって変異体マウスを雄の C57BL/6J と戻し交配させた。その結果、F1 マウス 4 マウスで同様の結果を得た。ホモ接合型、ヘテロ接合型、野生型の同腹子における嗜好-嫌悪行動を、48 時間 2 瓶選好性試験によって測定した。マウスは蒸留水と味溶液の選択を 48 時間自己のケージで行った。全ての行動解析には 12-24 週令の雄のマウスが使われた。マウスは一定の室温、湿度及び 12/12 時間明-暗サイクルにおいて各別にケージに入れられた。2 つの瓶の位置は 24 時間毎に代えてサイド嗜好性の影響を回避した。動物毎の総摂取量を測定し、式；嗜好率 = 味溶液の量 (ml) / 味溶液及び水の総摂取量 (ml) により嗜好性を計算した。結果を図 5 に示す。図 5 a は段階的濃度の食塩水、図 5 b は濃度固定の 3 種類の基本的な味物質についての結果を示し、ホモ接合型(-/-)、ヘテロ接合型(+/-)、野生型(+/+)とも 5 匹のマウスを用いた。図 5 a から、水分及び食塩充足条件下では食塩に対する濃度感受性は 3 つのグループにおいて変わらず、全てのグループにおいて 0.1 M の NaCl を最も好み、0.3 M 又はそれ以上の濃度に対し嫌悪を示し、ヌル変異体が水分及び食塩が充足した条件下では各種の味物質に対して正常な嗜好を示すことがわかった。また図 5 b から、甘味 (0.5 M の蔗糖)、酸味 (0.01 M の HCl)、苦味 (0.02 M のキニン塩酸塩) に対する嗜好性に差が無いことがわかる。

## 【0027】

## [電気生理学]



ヌル変異体の味反応の正常性を調べるため、NaCl味をつかさどる鼓索神経に関する電気生理学的分析を行った。12-24週令の雄マウス（正常条件のために野生型4匹とホモ接合型マウス5匹；急性食塩欲求条件のための上記マウス3匹及び5匹）にペントバルビタールナトリウム（60mg/kg）を腹腔内投与して深く麻酔した後に各マウスを気管切開し、頭保持具で固定した。鼓索神経を露出させて周囲の器官から隔離させ、ブラ（bulla）の入口部位で切断した。神経の全束を切断し白金ワイヤー記録電極上（0.1mm直径）に持ち上げた。中性電極を近傍の組織に付けた。神経活動は増幅され、オシロスコープに表示され、オーディオアンプリファイアーでモニターされた。増幅された信号は時間定数0.3秒で積分機に通され、スリップチャート記録計上に表示された。

## 【0028】

味溶液としては0.1Mの $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、0.1MのNaCl、0.5Mの蔗糖、0.01MのHCl、0.02Mのキニン塩酸塩（Q-HCl）、0.1MのKCl及び0.1Mの $\text{CH}_3\text{COONa}$ （AcNa）を用いた。これらの溶液は蒸留水及び0.1mMのアミロライド溶液を用いて作られた。各溶液及び洗浄水は室温（ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ）において舌の前面に適用された。舌は連続刺激の間に少なくとも45秒洗浄された。全神経反応は刺激開始10秒後における基線からの総和反応の高さとして測定された。各種の味刺激に対する鼓索神経における反応の記録結果を図6aに示す。また、0.1Mの $\text{NH}_4\text{Cl}$ に対する鼓索神経における反応を1とした場合の各種の味刺激に対する反応の強さを図6bに示す。

## 【0029】

0.02Mのキニン塩酸塩及び0.1Mの酢酸ナトリウムに対する神経生理学的反応は、ヌル変異体マウスと野生型マウスの間で同じ強さであった。0.1MのNaCl及び0.1Mの酢酸ナトリウムに対する反応はアミロライドによって両グループとも同じように減少したので、変異体マウスの味蕾におけるアミロライド感受性チャネルは正常に機能していると判断される。急性食塩欲求条件下でヌル変異体及び野生型マウスは同じような結果を示した。これらの知見を、水及び食塩充足条件下における各種味物質に対する正常な反応（図5）と併せ考えれば、ヌル変異体の味覚受容体は障害を受けていないことがわかる。

## 【0030】

水分飢餓条件下では高張状態を脱するために、動物は大量の水分を摂取し高張食塩水の摂取を避ける。次に24時間水分飢餓の前後における高張食塩水（0.3MのNaCl）に対する嗜好を調べた。試験に先立ちマウスは2つの瓶から水を飲むように1週間訓練された。水分欠乏の1日前の10時に水と0.3MのNaClの選択を与え、16時に液摂取量を測定した。翌日10時に両方の瓶を除き、水分飢餓期間中乾燥飼料が与えられた。24時間水分飢餓の後、両方の瓶を戻し液摂取量を16時に測定した。結果を図7に示す。ヌル変異体は水分不足状態で高張食塩水の異常摂取を示した。24時間水分飢餓の前後において0.3MのNaClに対する嗜好率（図7a）と総摂取量（図7b）を測定した。この実験におけるn数（匹）は、6(+/+), 6(+/-), 6(-/-)であり、図中の縦棒はS.E.を示し、\*印は $Na_v2^{-/-}$ マウスと $Na_v2^{+/+}$ マウスの間で有意差（ $p < 0.05$ ）が認められることを表している。水分飢餓の後には高張食塩水に明らかに低下した嗜好を示した野生型及びヘテロ接合型マウスと異なり、ヌル変異体マウスは嗜好率において変化が無かった（図7a）。総水分摂取量（水と0.3MのNaClの合計）は24時間水分飢餓の前後で変わらなかった。総水分摂取量は全てのグループが水分飢餓後には4倍以上となっていた（図7b）。

## 【0031】

また、水分飢餓処理の前後における血液を断頭術により回収し、血漿電解質の濃度を電解質分析器（9180、AVL Scientific、GA）によって測定した。水分飢餓の前後における血清中の電解質濃度は、野生型及びホモ接合型マウス（各 $n=6$ ）の両方で正常であった。野生型及びホモ接合型マウスにおける水分飢餓処理前の $Na^+$ 濃度（mM）はそれぞれ $153.6 \pm 0.6$ 及び $153.0 \pm 1.2$ 、 $K^+$ 濃度（mM）はそれぞれ $4.6 \pm 0.1$ 及び $4.7 \pm 0.1$ 、 $Cl^-$ 濃度（mM）はそれぞれ $118.5 \pm 0.6$ 及び $118.3 \pm 0.9$ であった。また、水分飢餓処理後の $Na^+$ 濃度（mM）はそれぞれ $151.6 \pm 0.8$ 及び $150 \pm 0.3$ 、 $K^+$ 濃度（mM）はそれぞれ $6.5 \pm 0.2$ 及び $6.7 \pm 0.2$ 、 $Cl^-$ 濃度（mM）はそれぞれ $116.0 \pm 1.0$ 及び $116.4 \pm 0.8$ であった。これらのデータは、ヌル変異体は過剰量のナトリウムを直ちに尿中に排

泄し、腎臓機能が正常であることを示している。

### 【0032】

更に利尿剤であるフロセミドを腹腔内注射する方法及び食塩欠乏食を与える方法で食塩欲求を誘導し、ナトリウム欠乏処理誘導性の食塩欲求試験を次の方法で行った。試験の前に水及び0.3MのNaCl摂取の対照測定を数日間にわたり行った。10時に0.12mlの通常食塩水(0.9%のNaCl)をマウス腹腔内に注射した。0.3MのNaClの瓶を取り除き、ナトリウム欠乏食を通常食の代わりに与えた。16時に通常食塩水の2回目の注射をした。その次の日の10時に水及び0.3MのNaClを与え12時、14時、16時に水及び0.3MのNaClの摂取量を測定した。その後同様なプロトコールで、同じマウスにより、フロセミド注射(0.12mlの通常食塩水中に0.6mg含有)、ナトリウム欠乏食でテストした(急性食塩欲求状態)。最後に通常のナトリウム含有食を与える点のみを変更したプロトコールによりナトリウム欠乏食の効果を評価した。結果を図8に示す。

### 【0033】

図8には、摂取された水及び0.3MのNaCl量が2時間毎の蓄積量として示されている。図8の上段にはナトリウムの無い食餌を通常食塩水注射と組み合わせた結果が、中段にはナトリウムの無い食餌をフロセミド注射と組み合わせた結果が、下段にはナトリウムを含む食餌をフロセミド注射と組合せた結果が、実験処理直後から2時間毎の0.3MのNaCl(右側)及び水(左側)の蓄積合計摂取量の平均値プロットとして示されている。この実験のn数(匹)は10(+/+), 10(+/-), 10(-/-)であり、図8中の縦棒はS.E.を示し、\*印は $Na_v2^{-/-}$ マウスと $Na_v2^{+/+}$ マウスの間で有意差( $p < 0.05$ )が認められたことを表している。図8からもわかるように、フロセミドの代わりに等張食塩水を腹腔内注射した場合(対照試験)に摂取した水及び0.3MのNaClの量はどのグループも同じであった(上段のグラフ)。フロセミド注射とナトリウム欠乏食によって誘導した急性食塩欲求条件下ではヌル変異体は野生型及びヘテロ接合型と比べて0.3MのNaCl摂取量の増加は約2倍であった(中段右のグラフ)。この異常な高張食塩水の摂取はナトリウム含有食を与えた場合には止ま

った（下段のグラフ）。

【 0 0 3 4 】

【発明の効果】

本発明の水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示すヌル変異非ヒト動物、例えば  $\text{Na}_v2$  チャネル遺伝子欠損マウスは、塩分過剰摂取実験モデル動物として有用である。またこの  $\text{Na}_v2$  チャネル遺伝子欠損マウスを用いることにより、 $\text{Na}_v2$  チャネルが脳内脊髄液におけるナトリウムイオンレベルを感知して指令を出す役割を担っていることや、 $\text{Na}_v2$  チャネルが中枢神経系の限られた部位におけるニューロンや上皮細胞、特に体液ホメオスタシスに関与する脳室周囲器官で発現することや、 $\text{Na}_v2$  チャネルが体液オスモル濃度知覚と食塩摂取行動の制御に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

【 0 0 3 5 】

【配列表】

# SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

<120> Nav2 channel gene-deficient non-human animals

<130> A011P24

<140>

<141>

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 446

<212> DNA

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 1

```

atgttgactt cccagagcc gaagggcctt gtccattca cggcagagtc acttgaactt 60
ataaaaaatc acattgctaa aaaatgcaac gaagagcatg aagaagaaga tttaaaacca 120
agccgggata tagaagcagg caaaaaactt ccatttgcct atggaaccct tcctcaagga 180
accgtgtcag agcccttgga agatgtggat ccatactact atgttaagag aaatactttc 240
atgggtcttaa acagaaacag agtcattctt aggttcaatg cggtttccat cctctgcacg 300
ttgtctcctt taagctctct cagaagagct gttatcaagg ttttggtgca cccctttttg 360
cgcctgctga ttttaattag tgttctcacc gacagcatac ttatgtgcat gagtaaccta 420
ccggaatgga tattggcagt agagaa                                     446
    
```

<210> 2

<211> 6927

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 2

```

aagctttact ctcacagaga aaagtcttct gagtgatcaa ttgccaacga tacaacctca 60
ccttagttta ccctgacctg tgaaagatgg ccttcaacag tggagaataa ggagttctag 120
ctgagatgtt tcattaagcg acatattcat ggatcagctt ttgatggcag attttcaggc 180
tccttttctc cactgccaat aattttacaa aacacaattt taaaattgta gtctttatgg 240
gaaacaattc atcctataga tgttgtcaag gacaaaacat tttcactcct gggcagtttt 300
gttgttccct tccctcactg tcatggcgct aaagcggtag ctcatcccca gattaggggc 360
ccaggtgtaa ttgttcttaa gtctgaaatt gtaggggaga gttctttgaa ctcatctctt 420
    
```

catgagttca aagaacatat gacaacttat tgatagaatg actttacaca tggccatatt 480  
 ttacacattt actattttac aggtataaaa ccgaaaatgt tgacttcccc agagccgaag 540  
 ggccttgtcc catttacaac agagtcactt gaacttatag aaaatcacat tgctaaaaaa 600  
 tgcaatgaag accccgaaga agaagaaggt ttaaaaccaa gtcgtaatct agaagctggc 660  
 aaaagacttc caattcccta tggaaccctc cctcgaggaa ccgtgtcaga gcccttggaa 720  
 gatgtggatc catactacta tgtaagaga aatgtaagta ttaactgtta tcattgaagc 780  
 tatattttac ttcgcttata ttcagccact tgaaatgtaa ttgagataag acttaaagaa 840  
 aattaataga gaaggcattc tttcataatc tattctttgt gggggtcaac atgctcaaga 900  
 tagttaaacc tgataaaata tctgagtaat atattatggt taatgaccgt agtatatata 960  
 ctgctattcc ttaatataag tggctattgt gaaaatatgc taattacat tttctgatta 1020  
 gcaattttta aacaatcatg aaatatttag aatatggaca gaaatttcaa ataccttgat 1080  
 aacttactag tcaaaacagt acatttattt ttaatcatat ataaatccac aaattcaaac 1140  
 ctccctcatt tccaggaaga ctttagagac ctagaaatta tgtatacaca aacacacaca 1200  
 cacacataca cacacacaca cgcacacgca aatgcacacc ctaccatcac aaacacaaaa 1260  
 taagtacaag aatgatttct gttagaaaat tcagacatgt ggattgatga agatagatga 1320  
 gtcttgtttc aaaagcatgg tttgggggct ggagaaatgt ctcagtttct aatagcactg 1380  
 gctgttcttc tggacgtcat aagattgatt gcagtccctg tacagtaggt cacagccttt 1440  
 tgtaactcta gtccagaag atttgacctt cttttggcca ctatgggcac tgggaatgca 1500  
 aataattcat atatgcacac agtgaagaca tctatatact tgaaatgaga taaaatttta 1560  
 ggtacagctt gcagaatact tggaatttta ataaagccaa ggtagaacag tttaggaca 1620  
 aatggaatgg caacagccaa gattgattct acaagagggc atagaaaggg ctgtgctatt 1680  
 actggaaaat cagttatgtt gttgactgtg gcaaactga gagagtggag gtgtcatcat 1740  
 ggaattactg tagtggacaa ggtcatttgg ggtgaatgtg gcagatgaat aaaaccaagc 1800  
 taataccttt ctttaattaa agaaaagtga tcaatacaga aaataaaaata gaacataaaa 1860  
 gacagggaga aatataaggt agagaagagg aggagagaaa gagatgaggg agaagagaag 1920  
 gggtgagaat gggaagagga agagaagaga gataggtaga aatgaagaga ggggaggaag 1980  
 ggacttgtat attacagtta atttacctag tgtacaaact gatagttctt agtataaatg 2040  
 gcttttatgt aaatatgatg attactgtct tctaattatc tatttttaaa taatcataaa 2100  
 atatttacac tataaaagaa aaagagagaa ggaggagaga aagaacaaga aggaaatagg 2160

gtagaggga ccctgagatt cagtgtctat gtcaggaaaa gaaacagtaa aatatgactg 2220  
 atgaaaaatg ccaatgtctg tagcttgaaa gagtgaagtt acattgacag aaagtgaat 2280  
 aaagtttatt tactagcatc ttgatattca tgtatcatat tcactgatgt tatatctaata 2340  
 gaggagatga gactgaacga aaatatctgc agaaaaatac attcattgca taactgttcc 2400  
 tataataatg tcatgggtgc atttgaaata ttttaaggac attttagtta aaatgcaagt 2460  
 tcagtcctca tttgtattgt tctggcactc actttgtggt gtgcttgagt tgataatggc 2520  
 cagtaacctt aggattgcct gtcaatattg cagccatctt aatactgagt aaggatatgca 2580  
 ggcatgctag acatgggaat actgccattg aagataaaat caaagctctt aagaaacaaa 2640  
 acaaatactt tatgacaggc cccatgtcca gcagtagttg gccaaaaaaa aaaaaaaaaa 2700  
 ttgtgatttt gattcttttg tcagggtggc atgtttggag acagggattc cctgagtagc 2760  
 cctggctgtc ctggaactca ctctgcagtc caggctggcc tcgaactcag agatctgctt 2820  
 gcttctgtct tctgagttct aggattacgg gtataagttt ttattaaaag tataaggctt 2880  
 tgctttttgt tgtgttttt tttgtttgt ttgtttgtt tgttttttgg ttggttgttt 2940  
 ttgttgttgt tgggtggtgt ggtggttagtg gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt 3000  
 gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtggaggg agagagagag tgtgctgttt ctgttggaat 3060  
 tttttgtcat tttctttta cttgttatgt tttggtttct ttgagaaaga atgaaggaa 3120  
 ctgaagttgg ttggatacgg gtgtggggag gatcttgaa tgagttgaga aaggacaaag 3180  
 aatataatca aagcttacta tatgaaaaat taaataaaat gtgaaataac taaaaaatc 3240  
 taaaaacaac attttgagt atttaggac ctagcagcta tgaggcccat gggttgaaat 3300  
 ttgccagtga cttcatgcac tctaaagcct gcaaatgtga cttcatgaac tctgaagcct 3360  
 gccagggtga cctcatgtc tttgaagcct gactgggtga ctttatgcac tcagtgtgc 3420  
 tctcagtaac atcacactgt tcaagtatct gggttgtatt tggcttactc tcttacacat 3480  
 agcacagaga caaataatca taaaattaag actatgtatg aaatcaggag aaaacctgaa 3540  
 agtacgcac ccttcacaat gacacacaca tatattgaac tccacatgga gtctgcaatt 3600  
 gttttggaag ctactatgga aagtagaatt tacacaacca ggtatattat ttgtttctac 3660  
 ctgttttatt taagtggaga tgggagaata ggtacaatag ttaaacaag cctcatagca 3720  
 gttatatatt gaactacact tatctgagaa ttgagacca gagtagattc cagttagagc 3780  
 agacatgcat ggagaagtgt tggcagttgt atattcttat aatttctttt tcatatgcgt 3840  
 ctgtcaacat aggaagcaat aagtcatacc tcctatatca ttatcagaat atatggtaga 3900

ctgtatagtc tattctattg catataagat taatttttaa gccaggcctt ctggcagggc 3960  
 tataattctc aaacaacaaa gtattgcaga ttcaagtcct ctgtggtcta aactgtgagt 4020  
 tcaaggtcag ccttaacaat ttaatgaaat ctattttcaa gagaaaaaga atataaagat 4080  
 cctcaggaga aataatggaa gagagtttgc ccagcacaca tgaggcccct gtcacagagg 4140  
 aagaaaatat tacatatattt ttattttataa aaatatagtt atcttattat ataacatgct 4200  
 atgttatgtt atgttttatg ttataacaca tgacatttaa tctcatagtt ttcagaatta 4260  
 actggatttt cagtgttagc tggatcaaac tcagggcctg ctgaagggtg aacaaacact 4320  
 gttcttcaag ttacattacc agacagtaca tgттаатgca cccctacatt aatactttct 4380  
 ctgaagggac atatatagta aacacacaca cacacacaca cacacatata tatatatata 4440  
 catatacaca cacacatata tatatacact ttcaattacc atatataata tataccatat 4500  
 acattatagt aatgttcatt tatatgaaca aatgtaaaaa tgagcacaca tatgtatgaa 4560  
 tgtacataag cccacatgta catatgtata aataagccca tccacctacc tatatatgga 4620  
 acaatgtctg ttttagaata tttatgtttc ttactatatt tattaagact tagtacttta 4680  
 gtatccacaa tccttgtgtt tatattacat aaattactat ttttagatag gttcatatca 4740  
 ataatattaa ataagttagg ttttgtaaaa acattaattt ttaggattta ctttgtaatt 4800  
 gttttatttt tttattcgat attttcttta ttacatttc aaatgctttc ccgaaagtcc 4860  
 cctataccct cccacctccc tgctccccta ctcacctact cccatttctt ggccctgggtg 4920  
 ttcccctgta ttggggcata taaagtttgc aagaccaagg ggtctctatt cccaatgatg 4980  
 gccgactagg ccatcttctg ctacatattc agctagagac acgagctctg gggatactgg 5040  
 ttaataattg ttttattttt aatataattt atttaaata gaattacata aattatcctc 5100  
 ttattttctc ccctacagtg tctccctcat aaataatata aacaattgat gtgagatttg 5160  
 accattgctt ttataacact tcattgactt tttttctgat ataaaattaa aatttttaca 5220  
 ttcattaagt tatgagataa aggccctctg atgctttgaa tgcaaatecca cacaccatct 5280  
 gaagagtttc tttttcatta gttcaagggtg tgattgcacc ataatgactt tcttaagtac 5340  
 aaaccagcaa aaaataaata aattaattaa ttattaaaat aaaataagtg gtgagctatc 5400  
 aggcaagtcc aaatataagt gaaaactact ccctttgctt taaaaacaaa tgtcaaagcc 5460  
 aatgaaaata tgaaataatt tcaaactggg gagcattggg aatatgttgc ttcagttctc 5520  
 cattctgttt gttaatgtct ttctgtgggt tccttacaga ctttcatggg cttaaacaga 5580  
 agcagagtca tcttcaggtt caatgcggtt tccatcttct gcacattgtc tcctctaaac 5640



tccctcagaa gagcagctat caaggctttg gtgcatccat atcctttcaa agtgtgatgg 5700  
 gttgtgtcat cggcatacta aaaataagtc ctgatgttct gtcattcaac ccctgttgta 5760  
 gtaatatatta acaaatatca attcttattc ttcaaataga atgacatgta ttttcaatat 5820  
 ttacaaaaga atctcgcccc ttatatctac agatgcaatt tactggctct ttgtaatgtg 5880  
 atttcttctc cattattcct tgaccctggc ttaccctttt tcgcctgctg attttaatca 5940  
 gcgtttctac tgacagcata cttatgtgca tgagtaatct accagaatgg atattggcaa 6000  
 tagagtaagt tacttagttt tgctatatat aataaagtct gtaattatat tttggtttta 6060  
 acattttaat atttattgta ttccattaaa ttacaaaac atgttatgaa atgaaacatg 6120  
 atactattta aatttttaaa tgtttaaaaa agttataaag acaagaggtt tgtttcactc 6180  
 acagctttga aggttcaaga gcacctatgc tgttcagctt cagggacaat taggtcctct 6240  
 cacctaatta acctgtggcc tgttgaaaca ggagaagctc tttcagaagc agccattcat 6300  
 gtcttgatgc tgtaagccca tgactgggtat gaagcctgcc acaacttttc tcttactctt 6360  
 cttgtgggtc ttgtgcaaac aagcaggcat gcgctccagt gccacaagga ccttcaagt 6420  
 caccacagct ctagtgctcc gtaaactctt gcctcaccat gatcgggatc aagttctaaa 6480  
 tatgtagaat attgtagaca tctgaaaaca aacctcatct tcatatttct tttctgtata 6540  
 tactcgtatg tttgtggggc atagcaatat gaacaccatg actaaatttt ctaaataaaa 6600  
 caaacatgta tatgcacata cacatatata tagatgtata ttcacatcaatt tgggggttta 6660  
 ttttgccctt tcattcttct tacttaattc ctgttgggtg tattttattt gattcatgtt 6720  
 ctttatacca ctgtcctttg actcctgttc cagactcttg aatcctggaa ttacatcttc 6780  
 ttatcacgac ttacatatc tacagttcta tatagactga aggtttaatt atattaatta 6840  
 attatgttca ttggaatatt taggtccttt gctaaatgta tataccatgt ttcacctcat 6900  
 gcttgttttc ttccttattt aaagctt 6927

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer1

<400> 3

atgttgactt ccccagagcc

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer2

<400> 4

aaccaggcaa agcgccattc

20

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer3

<400> 5

catcttccaa gggctctgac a

21

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の  $\text{Na}_v2$  ノックアウトマウスの遺伝子地図(a)、ゲノムDNAのサザンブロットの結果(b)、ゲノムPCRの結果(c)及びウエスタンブロットの結果(d)を示す図である。

【図 2】

本発明の  $\text{Na}_v2$  ノックアウトマウスの胚、脊髄神経節及び胸部における lacZ 発現部位を示す図である。

【図 3】

本発明の  $\text{Na}_v2$  ノックアウトマウスの脳における lacZ 発現部位を示す図である。

【図 4】

本発明の  $\text{Na}_v2$  ノックアウトマウスにおける Fos 核タンパクの発現に対する水分飢餓の及ぼす影響に関する結果を示す図である。

【図 5】

本発明におけるマウス  $\text{Na}_v2$  チャネル欠損がマウスの水分及び食塩摂取に及ぼす影響に関する結果を示す図である。

【図 6】

本発明の  $\text{Na}_v2$  ノックアウトマウスにおける各種の味刺激に対する鼓索神経における反応の結果を示す図である。

【図 7】

本発明の  $\text{Na}_v2$  ノックアウトマウスにおける 24 時間水分飢餓の前後において 0.3M の  $\text{NaCl}$  に対する嗜好率と総摂取量の測定結果を示す図である。

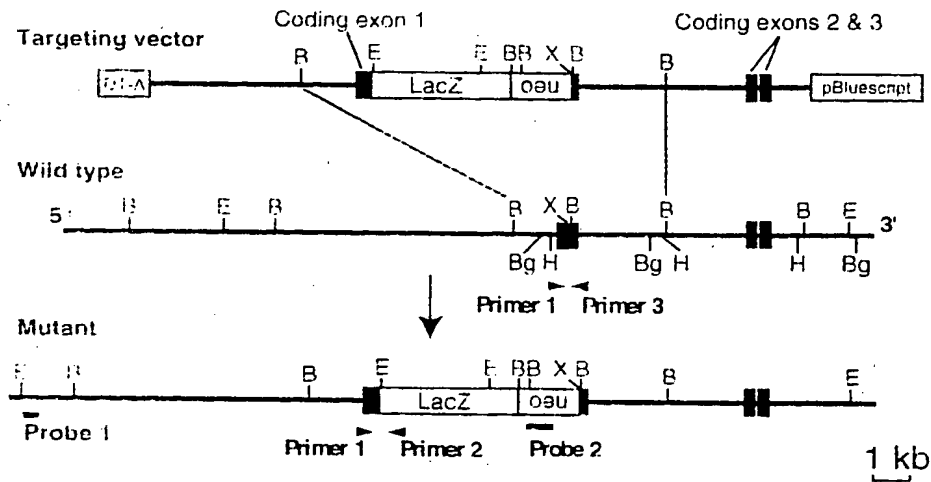
【図 8】

本発明の  $\text{Na}_v2$  ノックアウトマウスにおけるナトリウム欠乏処理誘導性の食塩欲求試験の結果を示す図である。

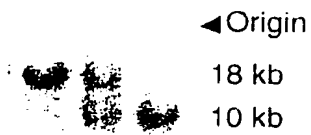
【書類名】 図面

【図 1】

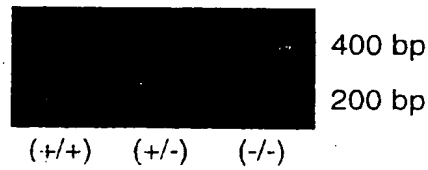
a



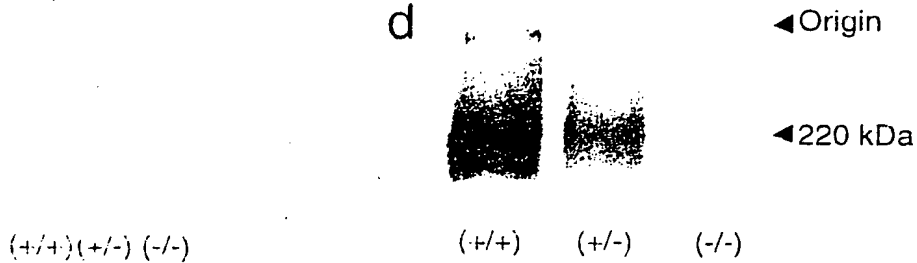
b



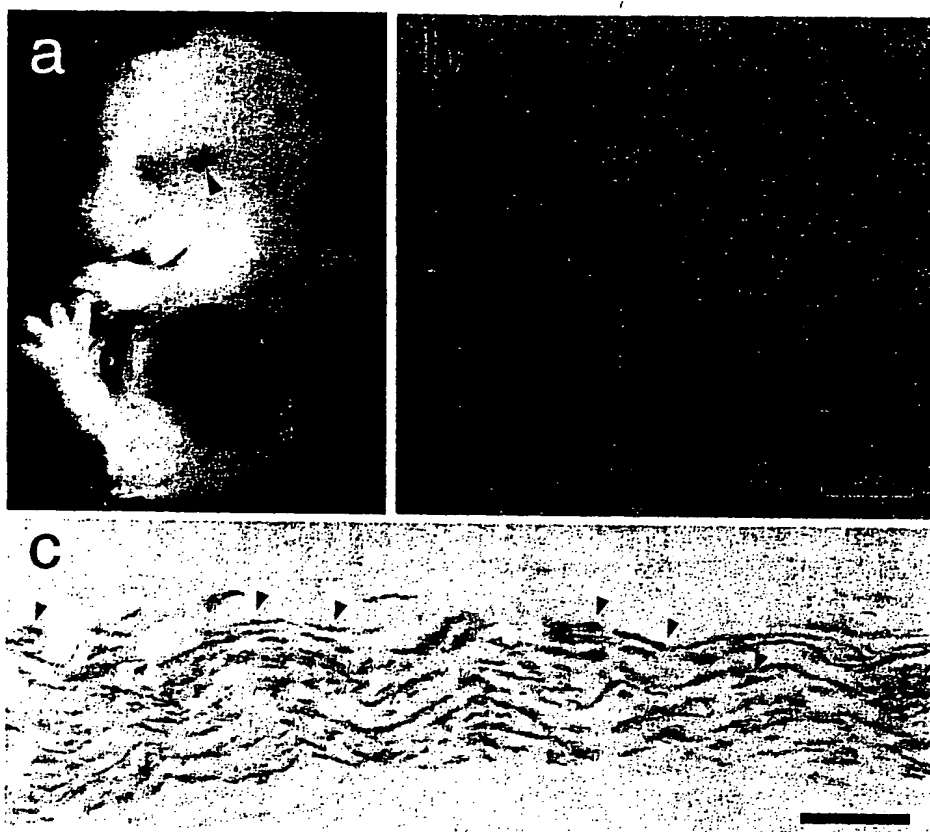
c



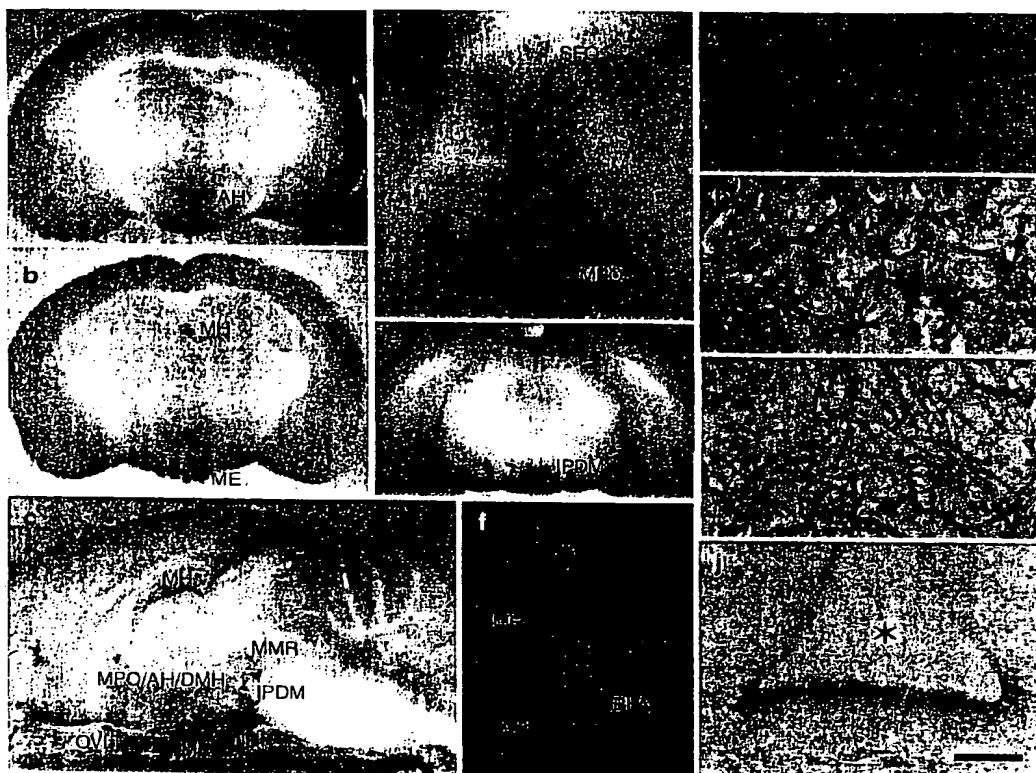
d



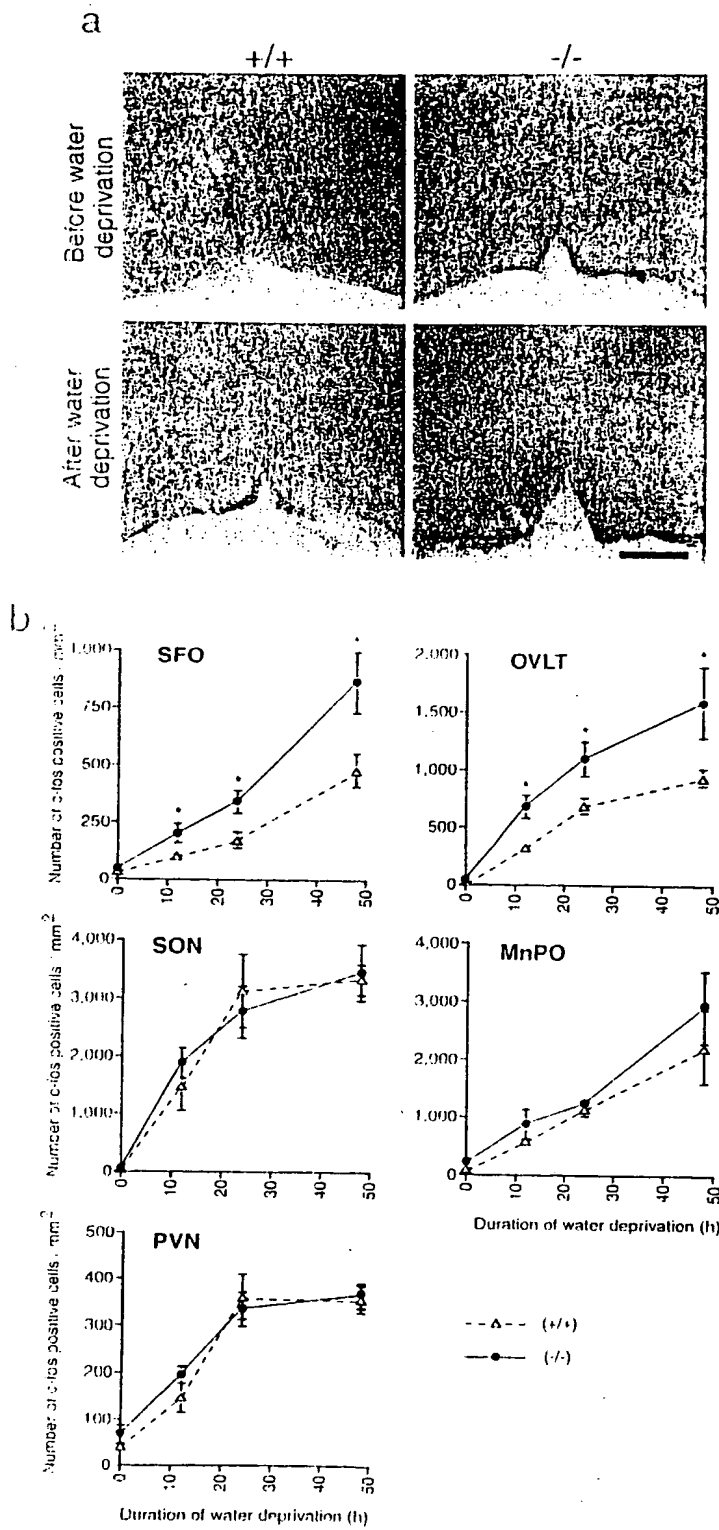
【図2】



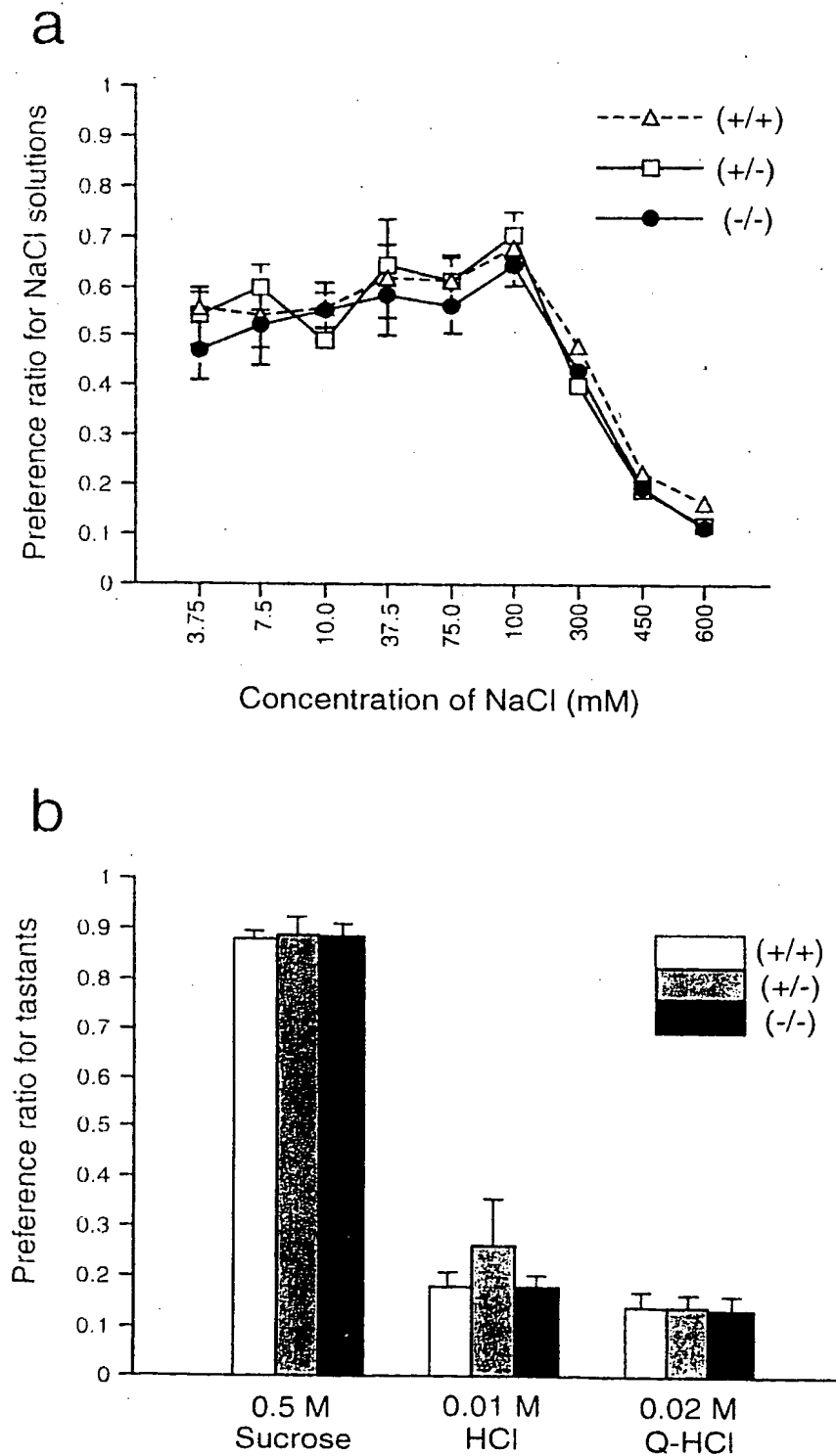
【図 3】



【図4】

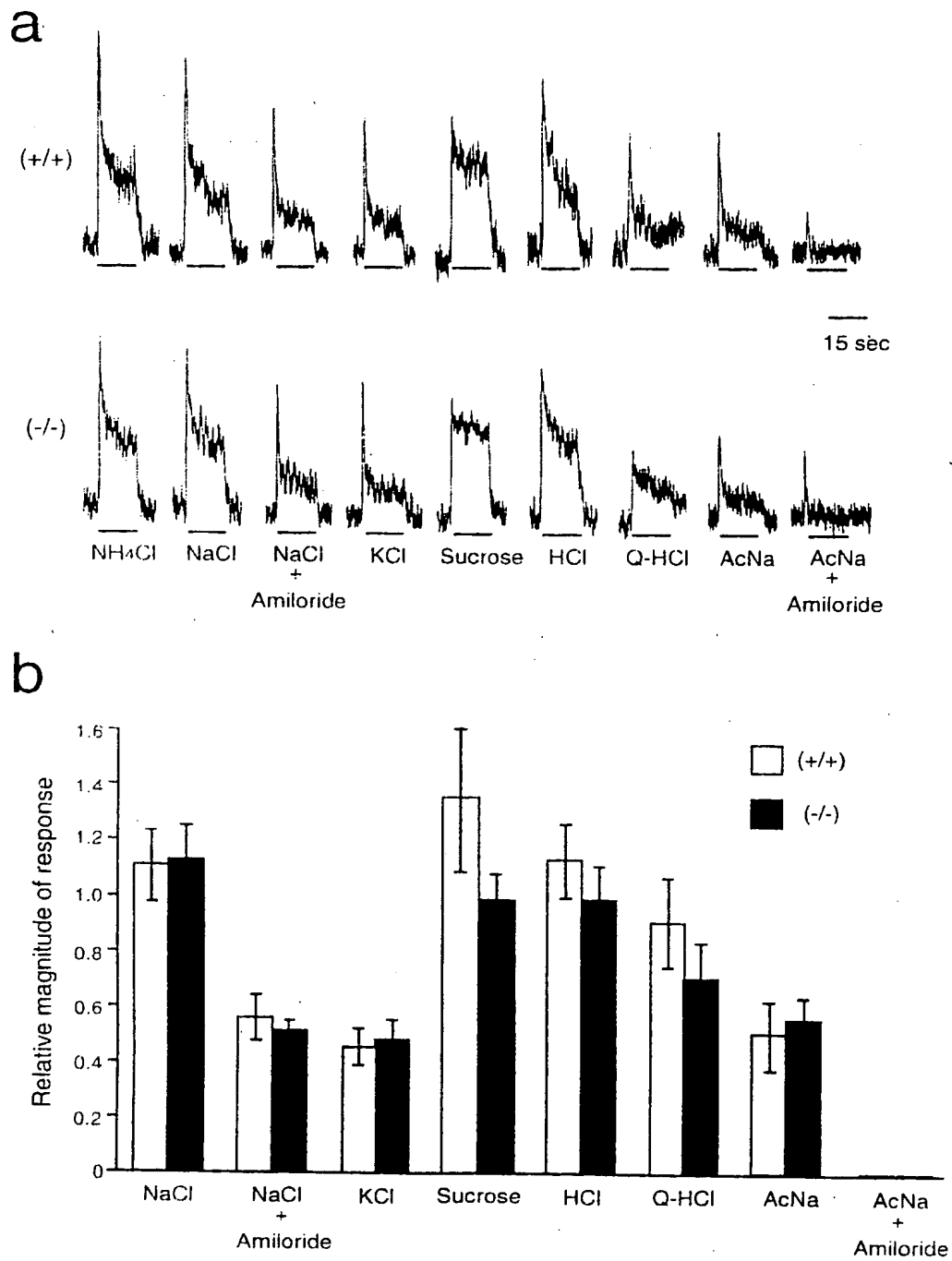


【図 5】

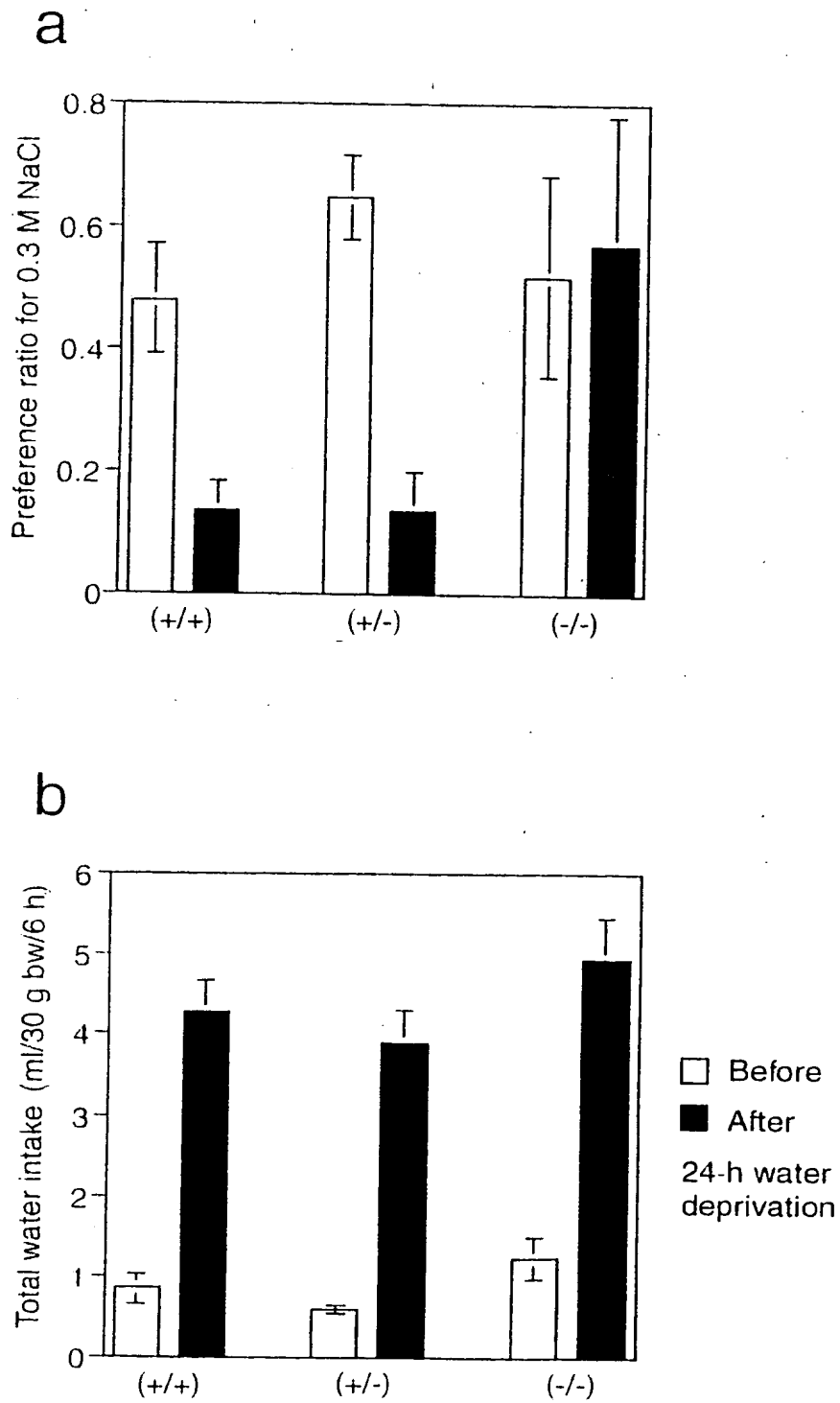




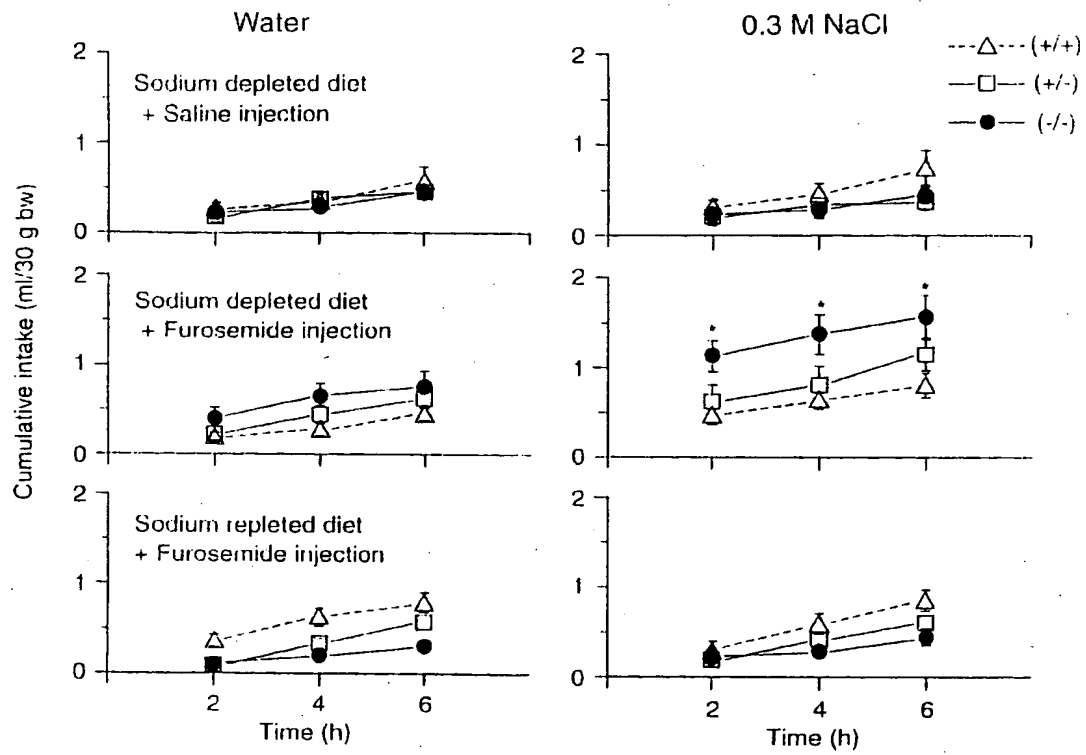
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 塩分過剰摂取実験モデル動物として有用な、水分充足条件下では野生型と同様な食塩の摂取挙動を示し、水分飢餓条件下では野生型に比べ多量の高張塩分の摂取挙動を示すヌル変異非ヒト動物、例えば $\text{Na}_v2$ チャネル遺伝子欠損非ヒト動物を提供すること。

【解決手段】 ラット $\text{NaGcDNA}$ をプローブとして、マウスのゲノムDNAライブラリーをスクリーニングし、ゲノムDNAの $\text{Na}_v2$ 遺伝子を単離し、 $\text{Na}_v2$ のエキソン部分に、ネオ遺伝子等マーカー遺伝子を挿入してターゲットベクターを作製し、作製されたターゲットベクターをES細胞に導入し、相同的組換えを起こしたES細胞を選択し、このES細胞系を用いて生殖系列のキメラマウスを作製し、野生型マウスと交配させることによって得られるヘテロ接合体マウス同士を交配させることによって $\text{Na}_v2$ ノックアウトマウスを作製する。

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日 1998年 2月24日

[変更理由] 名称変更

住 所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名 科学技術振興事業団